

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DA ESPÉCIE *Hydrocotyle leucocephala* Cham. & Schltdl.

Gustavo Mariano das Neves (IC) e Edgard Antonio Ferreira (Orientador)

Apoio: PIBIC CNPq

RESUMO

A espécie vegetal *Hydrocotyle leucocephala*, uma macrofita aquática nativa do Brasil, popularmente conhecida como Acariçoba-míuda ou erva-capitão, encontrada no território brasileiro e utilizada na medicina popular foi utilizada neste estudo para verificação do potencial da atividade antirradicalar de suas folhas. Para este estudo as folhas da espécie *H. leucocephala* foram submetidas a um processo de extração por maceração com metanol para gerar o extrato seco bruto. Em seguida, o extrato seco foi então ressuspenso em uma solução de metanol : água (1:9) e submetido a um processo de extração líquido-líquido para fornecer três fases, uma fase em hexano, acetato de etila e outra fase em butanol. Com base em estudo preliminar pela reação do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil 97% (DPPH) com as soluções das fases geradas em placa cromatográfica de sílica foi constatado potencial de atividade antirradicalar na fase em butanol. Desta forma, o extrato em butanol foi então submetido a experimentos para quantificar a atividade radicalar assim como obter o perfil cromatográfico da fase em butanol. Os experimentos realizados, supressão do decaimento do radical DPPH e comparação da porcentagem de atividade com o ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®) apresentaram baixa atividade antirradicalar apesar de ter sido caracterizado na fase em *n*-butanol seis flavonóis, três derivados de quercetina, dois de kaempferol e um de isorhamnetina.

Palavras-chave: Macrófitas aquáticas; atividade antioxidante; DPPH

ABSTRACT

The species *Hydrocotyle leucocephala*, an aquatic macrophyte native from Brazil, popularly known as Acariçoba-míuda or herb-captain, found in Brazilian territory and used in folk medicine was used in this study to verify the potential of the antiradical activity of its leaves. For this study, the leaves of the species *H. leucocephala* were submitted to a process of extraction by maceration with methanol to generate the crude dry extract. Then, the dry extract was then resuspended in a solution of methanol: water (1: 9) and subjected to a liquid-liquid extraction process to provide three phases, a phase in hexane, ethyl acetate and another phase in butanol. Based on a preliminary study by the reaction of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil 97% (DPPH) with the solutions of the phases generated in a silica chromatographic plate, the potential of antiradical activity in the butanol phase was found. In this way, the butanol extract was then subjected to experiments to quantify the radical activity as well as to obtain the chromatographic profile of the butanol phase. The experiments carried out, suppression of DPPH radical decay and comparison of the percentage of activity with 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox®) showed low antiradical activity despite having been characterized in n-butanol phase six flavonols, three derivatives of quercetin, two of kaempferol and one of isorhamnetin.

Keywords: Aquatic macrophytes; antioxidant activity; DPPH

1. INTRODUÇÃO

Os radicais livres, espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado e possuem alta reatividade, podem reagir com biomoléculas e como consequência provocar danos celulares associados a muitas doenças. Com o aumento dos níveis de poluição, a radiação ultravioleta, o consumo exagerado de tabaco, bebidas alcoólicas e alimentos industrializados as pessoas ficaram mais expostas as substâncias e condições que podem provocar um aumento na produção dos radicais livres no organismo.

Reconhecidamente, as plantas são uma importante fonte de moléculas bioativas, e dentre as moléculas obtidas a partir de fontes naturais com atividade antirradicalar pode-se citar o ácido ascórbico, flavonoides, entre outros. No entanto, há muitas espécies vegetais que não foram avaliadas amplamente quanto ao potencial como fonte de substâncias bioativas, como é o caso das macrófitas aquáticas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

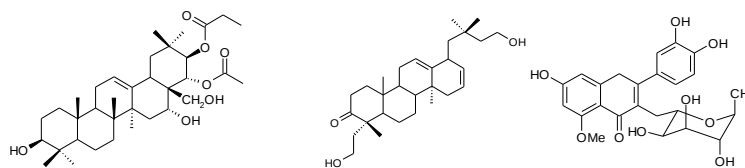
As macrófitas aquáticas também conhecidas como plantas aquáticas adaptaram-se de forma muito efetiva ao ambiente que vivem ao longo do seu processo evolutivo. Contam com aproximadamente 2600 espécies distribuídas por mais de 450 gêneros e estão representadas por sete grandes grupos: cianobactérias, clorófitas, rodófitas, xantófitas, briófitas, pteridófitas e espermatófitas (CHAMBERS et al., 2008).

2.1. Gênero *Hydrocotyle*

A família Araliaceae possui 40 gêneros que conta com 1500 espécies com ocorrência desde os Estados Unidos até Argentina (SILVA et al., 2010). Os gêneros encontrados no Brasil são *Aralia*, *Dendropanax*, *Oreopanax*, *Panax*, *Polyscias*, *Schefflera* e *Hydrocotyle* presentes nos mais diversos biomas (FIASCHI et. al., 2008)

Estudos fitoquímicos já realizados com espécies do genero *Hydrocotyle* apresentaram uma grande diversidade de compostos químicos. A partir do extrato metanólico de *H. ranunculoides* foram isolados triterpenos glicosilados e polioxigenados (GRECA et al., 1993). Estudos com *H. sibthorpioides* e *H. bonariensis* mostraram a presença de saponinas glicosiladas (MATSUSHITA et al., 2004; HUANG et al., 2008; TABOPDA et al., 2012) (Figura 1).

Figura 1: Substâncias isoladas de espécies do gênero *Hydrocotyle*.



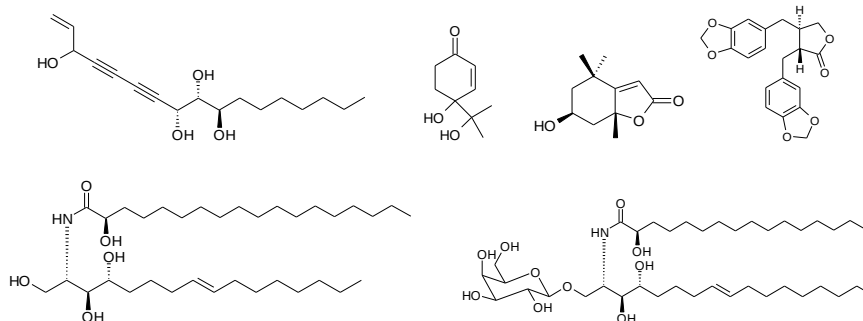
Estudos da avaliação fitoquímica envolvendo a espécie *Hydrocotyle leucocephala* (Figura 2) revelaram a presença de diacetilenos, ceramidas e cerebrosídeos obtidos a partir do extrato em acetato de etila após partição líquido-líquido do extrato bruto em metanol (Figura 3). (RAMOS et al., 2006)

Figura 2: Espécie *Hydrocotyle leucocephala*.



Fonte: autores

Figura 3: Substâncias isoladas do extrato em acetato de etila espécies do gênero *H. leucocephala*.



2.2. Atividade antioxidante

Muitas reações bioquímicas geram espécies altamente reativas de forma espontânea. Estas espécies são divididas em dois grupos; espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), tendo como principais espécies químicas em ambos os casos, os radicais livres. (NIMSE e PAL, 2015)

Estas espécies reagem com muitas classes de biomoléculas, sobretudo ácidos graxos

poli-insaturados. Este processo é chamado peroxidação lipídica e é muito agressivo, uma vez que ocorre a propagação de radicais livres ocasionando reações em cadeia e consequentemente afetando um maior número de células e acarretando maiores danos ao organismo. (NIMSE e PAL, 2015)

Da mesma forma como ocorre a formação de radicais livres, também ocorre a formação de espécies químicas que atuam no controle da produção de radicais livres e danos causados as células do organismo, estas substâncias são classificadas como antioxidantes.

Existe naturalmente um balanço entre a formação dos radicais livres e a formação dos antioxidantes, espécies químicas que reagem com os radicais livres. No entanto, em muitas situações, ocorre alta produção de radicais livres leva ao que se chama de estresse oxidativo, que é um desequilíbrio entre formação de espécies reativas e compostos que agem na inibição de tais espécies reativas. (BREWER, 2011) Diante de condições de estresse oxidativo, o organismo produz muito mais radicais livres do que espécies que reagem com estes. Como resultado, os radicais livres reagem com biomoléculas e consequentemente danos a células e órgãos. Entre os danos, pode-se citar o envelhecimento precoce cutâneo e doenças associadas a formação destes radicais livres, como câncer e doenças neurodegenerativas. (VALKO *et. al.*, 2007)

3. METODOLOGIA

Os solventes utilizados nas extrações e partições líquido-líquido acetato de etila, metanol e butanol, foram de grau PA da marca Labsynth utilizados sem prévio tratamento.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) forão realizadas com acetonitrila (Merck) e água ultra pura.

Para a concentração dos extratos foi utilizado rotaevaporador BUCCHI, sob pressão reduzida, equipado com bomba de vácuo BUCCHI modelo V- 700/710.

As amostras injetadas em CLAE foram previamente filtradas em filtro de seringa PVDF hidrofílico (0,22 µm).

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) forão realizadas em Cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Infinity Series com detector por varredura de espectro no Ultravioleta por arranjo de fotodiodos (DAD-UV/VIS), modelo 1260 Infinity Series e módulo de tratamento de dados ChemStation Editon.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em um espectrômetro de massa do tipo *ion trap* Esquire plus 3000 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) com uma

interface de *electrospray* (ESI). O software de análise de dados utilizado foi o Bruker Daltonics Compass DataAnalysis. A análise de espectrometria de massas foi conduzida no modo íon positivo e modo íon negativo, operada de acordo com as seguintes condições: temperatura do gás nitrogênio - 300 ° C; taxa de fluxo do gás de secagem - 12 L min⁻¹; tensão capilar - 4500 V; pressão de nebulização - 30 psi.

Como fase estacionária para as análises cromatográficas foi utilizada uma coluna Phenomenex Luna (250 x 4,60 mm) e 5 µm de diâmetro de partícula.

Nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante foram utilizados o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil 97% (DPPH) da Sigma-Aldrich, ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®) da Sigma-Aldrich.

Para os ensaios da atividade antirradicalar pelos métodos propostos foi utilizado espectrofotômetro UV-VIS da marca Agilent modelo 8453.

3.1. Coleta do material vegetal, identificação e obtenção dos extratos

O material vegetal foi obtido a partir de um produtor de plantas aquáticas situado no município de Suzano/SP, almejando um estudo de forma sustentável e para preservar a biodiversidade.

A confirmação da espécie *H. leucocephala* foi realizada a partir da exsicata da espécie vegetal contendo galho, folhas e flores pelas Profa. Dra. Oriana Aparecida Fávero, da Universidade Presbiteriana Mackenzie e pela Profa. Dra. Fátima Otaviana de Souza Buturi da Universidade São Judas. A exsicata foi depositada no herbário SPF do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, após confirmação da identidade da espécie.

As folhas do da espécie vegetal foram submetidos à secagem em estufa sob ventilação a 40°C por 24 horas, visando eliminação de água, então moídas e submetidas a extração com metanol até esgotamento do material a ser extraído, gerando-se o extrato. O metanol foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida para obtenção extrato bruto metanólico seco.

O extrato em metanol seco foi então ressuspendido em uma solução metanol/água (1:9/v:v) e submetido a uma extração líquido-líquido em funil de separação utilizando solventes em ordem crescente de polaridade hexano, acetato de etila e butanol respectivamente.

3.2. Avaliação preliminar da atividade antioxidante dos extratos

A fim de se obter informações a respeito do potencial das fases em hexano, acetato de etila, butanol e metanol como fonte de substâncias com atividade antirradicalar, uma

análise preliminar foi realizada. Para tal, uma alíquota de cada fase seca foi utilizada para preparar cinco soluções nas concentrações de 100, 75, 50, 25, 10 e 5 mg mL⁻¹ e aplicados em placa cromatográfica de sílica com auxílio de uma pipeta automática com volume de 2 µL e então aspergido uma solução do radical livre DPPH 0,4 mg mL⁻¹ sobre os *spots* dos extratos. Os *spots* que após a reação apresentaram coloração amarela indicaram a presença de compostos com potencial antirradicalar, pois o DPPH apresenta coloração violeta, no entanto quando recebe um próton para tornar-se estável tem a cor alterada para amarelo.

3.3. Avaliação da cinética de reação entre o extrato butanólico de *H. leucocephala* e DPPH

A partir de uma solução estoque de concentração 1,0 mg mL⁻¹ da fase em butanol de *H. leucocephala*, foram preparadas 4 soluções com concentrações de 200 µg mL⁻¹, 160 µg mL⁻¹, 120 µg mL⁻¹ e 80 µg mL⁻¹ respectivamente por diluição.

Em seguida foi preparada uma solução de DPPH com concentração de 120 µg mL⁻¹ e então transferida e estocada em frasco âmbar coberto por papel alumínio.

No espectrofotômetro UV-VIS configurado para medir a absorbância a cada 3 segundos em 517 nm, o branco foi acertado utilizando metanol numa cubeta de quartzo.

As soluções foram preparadas utilizando 3 mL de cada solução da fase em butanol e 1 mL da solução contendo o radical livre DPPH, resultando nas concentrações finais das soluções de 60 µg mL⁻¹, 90 µg mL⁻¹, 120 µg mL⁻¹ e 150 µg mL⁻¹, respectivamente.

Estas foram homogeneizadas e transferidas rapidamente para a cubeta e realizada a leitura da absorbância das soluções no espectrofotômetro UV-VIS.

3.4. Avaliação da atividade antirradicalar pela supressão da absorbância do DPPH pelo extrato butanólico de *H. leucocephala*

A partir da fase butanólica da espécie *Hydrocotyle leucocephala*, foram preparadas três soluções estoque de concentração 1 mg mL⁻¹, utilizando metanol como solvente. Por diluição da solução estoque foram preparadas soluções de menores concentrações, 220 µg mL⁻¹, 180 µg mL⁻¹, 140 µg mL⁻¹, 100 µg mL⁻¹ e 60 µg mL⁻¹.

A solução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi preparada pela dissolução de 3,00 mg do mesmo em metanol em balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se concentração de 120 µg mL⁻¹. Finalmente a solução foi transferida e estocada durante as análises em frasco âmbar coberto por papel alumínio.

Para a avaliação da atividade antirradicalar, inicialmente foram feitas leituras das soluções em triplicata utilizando metanol como branco. Assim, em um frasco âmbar foram adicionados 3 mL de metanol e 1 mL da solução de DPPH seguido da leitura, obtendo-se então o valor de absorbância inicial.

Em seguida, as reações entre a solução do radical DPPH e das soluções da fase em estudo foram realizadas pela adição de 1 mL e 3 mL, respectivamente de cada solução em frasco âmbar. Após a adição das soluções as concentrações finais foram de $165 \mu\text{g mL}^{-1}$, $135 \mu\text{g mL}^{-1}$, $105 \mu\text{g mL}^{-1}$, $75 \mu\text{g mL}^{-1}$, $45 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente e $90 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a solução de DPPH.

Após 30 minutos, o conteúdo reacional foi transferido para cubeta de quartzo e então realizada a leitura no espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 517 nm para cada solução gerando-se os espectros de absorbância e com os valores de absorbância em 517 nm, foi obtido a média das três leituras e então gerada a curva analítica no software Origin Pro 7.0.

3.5. Avaliação da atividade antirradicalar para a substância controle Quercetina.

A partir da Quercetina, foram preparadas 3 soluções estoque com concentração de 1 mg mL^{-1} . Foram então preparadas por diluição soluções de menores concentrações: $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; $2 \mu\text{g mL}^{-1}$; $3 \mu\text{g mL}^{-1}$; $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Em seguida foi preparada uma solução de DPPH com concentração de $120 \mu\text{g mL}^{-1}$. Então transferida e estocada em frasco âmbar coberto por papel alumínio.

Para a avaliação da atividade antirradicalar, inicialmente foram feitas leituras das soluções em triplicata, utilizando metanol como branco. Para tal, foi adicionado 3 mL de metanol e 1 mL da solução de DPPH, e realizada a leitura da solução para obtenção do valor inicial de absorbância.

A avaliação da atividade antirradicalar foi feita pela reação entre o radical livre DPPH e as soluções da substância antirradicalar Quercetina em triplicata, reagindo na proporção de 3 mL da solução de Quercetina e 1 mL da solução do radical livre, em frasco âmbar por 40 minutos antes de registrar a absorbância no comprimento de onda de 517 nm. As concentrações das soluções após a diluição com DPPH foram ajustadas para $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$; $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,25 \mu\text{g mL}^{-1}$; $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente e a concentração de DPPH, $90 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Foi obtido a média das três leituras e então gerada a curva analítica no software Origin Pro 7.0.

3.6. Avaliação da atividade antirradicalar para a substância controle Trolox®.

A partir do ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), foram preparadas 3 soluções estoque com concentração de 1 mg mL^{-1} , então preparadas por diluição soluções de menores concentrações: $2,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $3,76 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $5,01 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $6,26 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $7,51 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Seguidamente foi preparada uma solução de DPPH com concentração $120 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. A qual foi transferida e estocada em frasco âmbar coberto por papel alumínio durante todo o ensaio.

Para a avaliação da atividade antirradicalar, inicialmente foram feitas leituras das soluções em triplicata, utilizando metanol como branco. Em sequência foram adicionados 3 mL de metanol e 1 mL da solução de DPPH, medindo a absorbância em seguida para obtenção do valor inicial.

A avaliação da atividade antirradicalar foi medida pela da reação entre o radical livre DPPH e as soluções em triplicata da substância antirradicalar Trolox®, efetuando a reação na proporção de 3 mL da solução de Trolox® e 1 mL da solução do Radical. Então, após homogeneizar a solução, foi deixada em repouso por 15 minutos, fazendo a medida do valor de absorbância em seguida. A concentração do Trolox, após dissolução foi ajustada para: $1,88 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,82 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $3,76 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $5,07 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $5,63 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e a solução do DPPH foi ajustada para $90 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Foi obtido a média das três leituras e então gerada a curva analítica no software Origin Pro 7.0.

3.7. Perfil cromatográfico do extrato butanólico de *H. leucocephala* e identificação de flavonóides por espectrometria de massas.

Para obtenção do perfil cromatográfico da fração butanólica foi preparada uma solução metanólica contendo 1 mg mL^{-1} do extrato butanólico, sendo filtrada através de filtro de seringa hidrofílico e transferida para vial de 2 mL.

O perfil cromatográfico foi obtido pela da análise do extrato butanólico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando como fase estacionária a coluna Phenomenex Luna C-18 (250 x 4,60 mm) e 5 μm de diâmetro de partícula, sob temperatura constante de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e injetados 10 μL da amostra sob um gradiente da fase móvel composta por acetonitrila e solução de ácido fórmico 0,1%, seguindo os parâmetros apresentados na tabela 1.

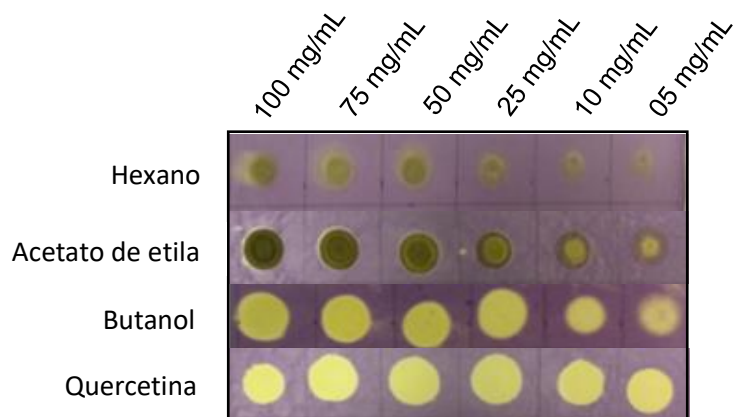
Tabela 1: Gradiente de solventes utilizados na análise por CLAE do extrato em butanol

Tempo (min.)	Ácido fórmico 0,1 % (%)	Acetonitrila (%)
0	95	5
60	75,5	24,5
65	95	5

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Resultados preliminares da atividade antirradicalar dos extratos

Como resultado da reação do radical DPPH com os *spots* das fases (Figura 4) pode-se constatar que a fase em butanol apresentou potencial atividade antirradicalar uma vez que é possível verificar a coloração amarelada dos *spots*. A comparação com os *spots* referentes a quercetina, substância que apresenta alta atividade antirradicalar deixam claro o potencial do extrato em butanol, enquanto os extratos em hexano e acetato de etila apresentaram uma baixa atividade quando comparados com a quercetina e até mesmo o extrato em butanol.

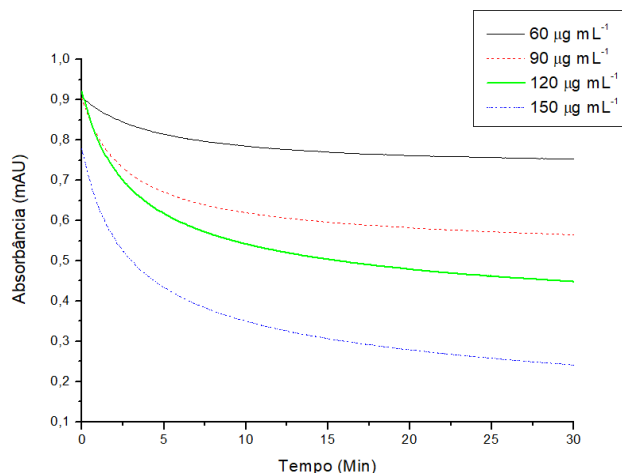
Figura 4: Avaliação preliminar da atividade antioxidante dos extratos de *H. leucocephala*.

4.3. Avaliação da cinética de reação entre o extrato butanólico de *H. leucocephala* e DPPH.

A partir da observação do gráfico da cinética de reação obtida pela medida da absorbância do DPPH em 517 nm ao longo de 30 minutos da reação com a fase em butanol em diferentes concentrações, pode-se observar que a partir de 30 minutos as curvas de decaimento da absorbância atingem um patamar indicando que o radical DPPH não está mais reagindo com os compostos presentes nos extratos e assim indicando que o tempo de reação ideal para o estudo em questão é de 30 minutos.

O tempo foi definido como 30 minutos, e as concentrações de trabalho foram definidas levando em conta os resultados demonstrados na Figura 5.

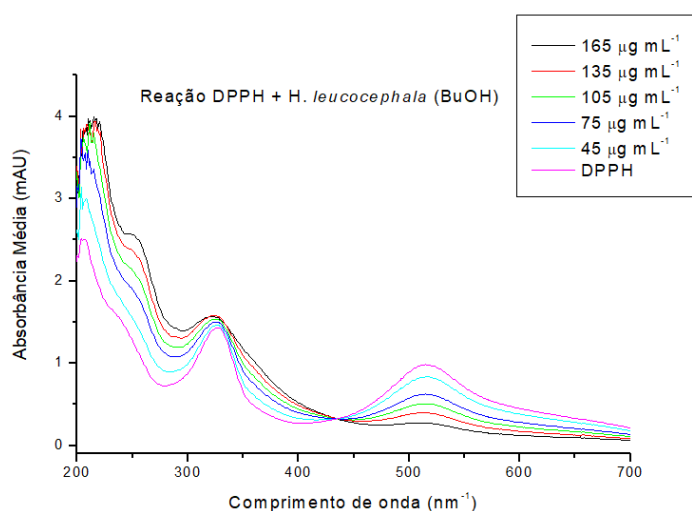
Figura 5: Estudo da cinética de reação das soluções do extrato de *H. leucocephala* em diferentes concentrações.



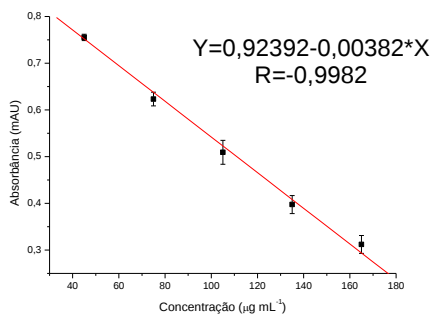
4.2 Avaliação da atividade antirradicalar pela supressão da absorbância do DPPH pelo extrato butanólico de *H. leucocephala*

A avaliação da reação das soluções da fase em butanol em diferentes concentrações apresentou uma queda da absorbância em 517 nm conforme aumentou-se a concentração da solução, indicativo de que a relação entre concentração e atividade está sendo correta. Com os resultados obtidos, foi então gerado o gráfico dos valores médios da absorbância do DPPH (figura 6)

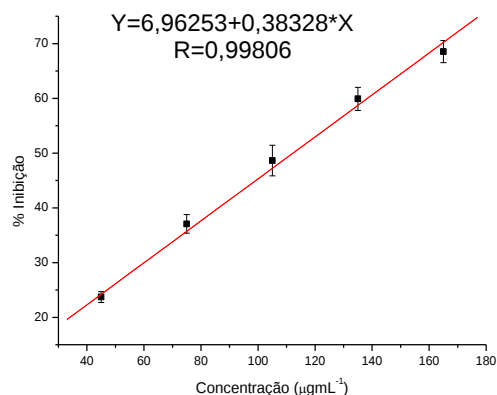
Figura 6: Espectro de absorção do radical DPPH



A fim de quantificar a atividade antirradicalar, com os resultados de absorbância obtidos foi gerada uma curva analítica a partir da média dos valores de absorbância (Figura 7) e expressa pela equação $Y=0,92392-0,00382 \cdot X$ que apresentou excelente correlação linear ($R=0,9982$).

Figura 7: Curva analítica do extrato de *H. leucocephala* frente a supressão do DPPH.

Os resultados de absorbância obtidos foram então convertidos para porcentagem de inibição onde foi obtida a equação $Y = 6,96253 + 0,38328 * X$ e finalmente pela correlação linear foi estabelecido que o valor de IC_{50} (figura 8) para o extrato butanólico foi de $112,29 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 8: Curva analítica da porcentagem de inibição de DPPH do extrato de *H. leucocephala*.

4.3 Avaliação da atividade antirradicalar para a substância controle Quercetina.

Utilizando a mesma metodologia empregada para a avaliação da atividade antirradicalar da fase butanólica, com a obtenção das curvas analíticas (figuras 9 e 10) foi obtido pela correlação linear o valor de IC_{50} da Quercetina de $2,84 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ser utilizado como parâmetro de eficiência do extrato como fonte de substâncias antirradicais.

Figura 9: Curva analítica obtida através da triplicata realizada com a Quercetina

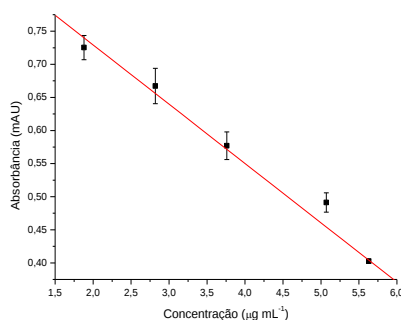
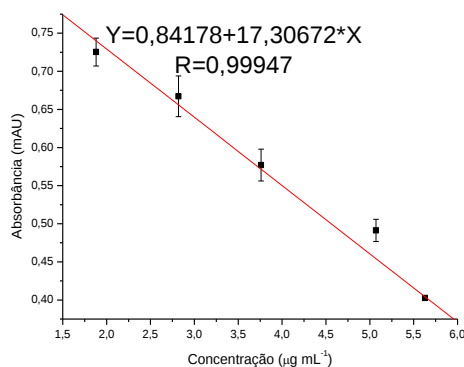


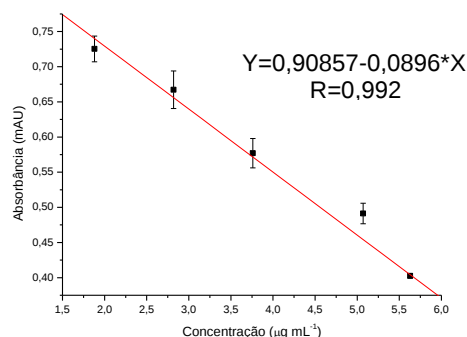
Figura 10: Curva analítica obtida através da triplicata realizada com a Quercetina



4.3 Avaliação da atividade antirradicalar para a substância controle Trolox®.

A obtenção da atividade antirradicalar expressa pela porcentagem de trolox deu-se pela construção na curva analítica a partir da reação do trolox com o DPPH (Figura 11).

Figura 11: Curva analítica obtida a partir do ensaio do DPPH com Trolox®



A partir da relação do coeficiente angular do extrato em butanol pelo coeficiente angular do trolox (equação 1) a atividade antirradicalar pela porcentagem de Trolox foi de 4,24%, demonstrando baixa atividade antirradicalar.

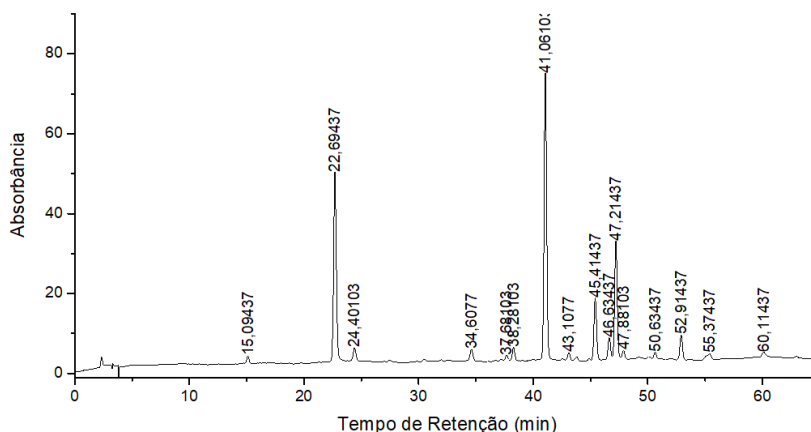
Equação 1: Percentual da atividade antirradicalar trolox equivalente a uma amostra.

$$\%T = \frac{\alpha A}{\alpha T} \cdot 100 \text{ (equação 1)}$$

4.4 Perfil cromatográfico da fase butanólica

O método cromatográfico utilizado para verificar o perfil cromatográfico da fase em butanol apresentou uma excelente resolução conforme apresentado na figura 12. O comprimento de onda utilizado em 330 nm para verificação de compostos fenólicos apresentou excelente detecção.

Figura 12: Cromatograma da fase em butanol



4.5 Caracterização de flavonoides

A partir da análise HPLC-UV-DAD da fase *n*-BuOH, foi possível inferir a presença de compostos fenólicos, mais precisamente flavonóis com base em seu comprimento de onda de absorção máximo característico na região do UV que compreende bandas de absorção variando de 350 a 385 nm e 250 a 290 nm (TSIMOGIANNIS, et. al, 2007). Para obter informações mais significativas e detalhadas sobre a estrutura dos flavonóis presentes nesta fase, as mesmas condições cromatográficas foram aplicadas às análises por HPLC-ESI-MS² no modo positivo e negativo. A partir disso, foi possível caracterizar seis compostos a partir de um intenso estudo de seus espectros de massa, incluindo íons específicos e padrões de fragmentação de agliconas e carboidratos a eles conectados.

Devido ao íon observado com *m/z* variando de 465 a 611 nos espectros de modo positivo de ionização e padrões de fragmentação que proporcionaram os íons Y_1^+ e Y_0^+ , foi possível afirmar que todos os compostos estavam ligados a uma glicona. A ligação entre glicona e aglicona foi estabelecida como tipo O-glicosídeo para todos os compostos, uma vez que O-glicosídeos protonados dão origem a íons formados por reações de rearranjo nas ligações interglicosídicas no modo positivo. A clivagem nas ligações O-glicosídicas ocorre com um rearranjo de H concomitante que resulta na eliminação de resíduos de monossacarídeos como hexose (162 u), desoxihexose (146 u) e pentose (132 u) resultando em um fragmento com alta intensidade atribuída à aglicona, como quercetina (*m/z* 303), kaempferol (*m/z* 287) e isorhamnetina (*m/z* 317). Este comportamento foi detectado nos espectros para todos os compostos descritos neste estudo e corrobora com estudos anteriores (CUYCKENS E CLAEYS, 2004; VUKICS E GUTTMAN, 2010).

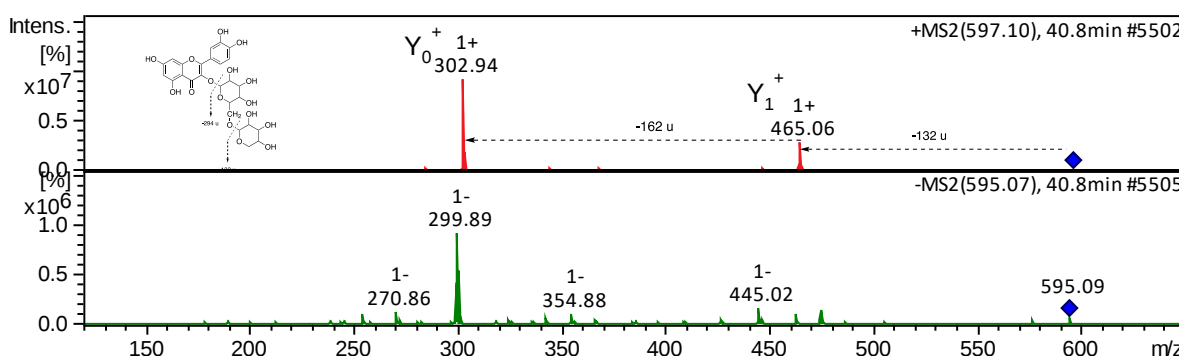
Os resíduos de carboidratos para flavonóis geralmente estão ligados à posição 3 ou 7 da aglicona e raramente na posição 5, uma vez que os efeitos estereoquímicos desempenham um papel crucial, reduzindo a chance de uma ligação nesta posição com a unidade de glicana.

Entre a ligação 3-O e 7-O, a diferenciação pode ser alcançada com base nos padrões de fragmentação no espectro de íons no modo negativo. Em um estudo proposto por Ablajan e colaboradores (2006), foi observado que nos espectros do modo negativo de flavonóis com resíduos de 7-O-glicona, é gerado o íon que corresponde a $[\text{aglicona-CO}]^-$ enquanto para resíduos de 3-O-glicona, o íon observado é $[\text{aglicona-2H-CO}]^-$. A partir disso, foi possível observar que todos os compostos deste estudo apresentaram o mesmo comportamento de fragmentação para $[\text{aglicona-2H-CO}]^-$ e concluiu-se que a ligação foi feita na posição 3-O com base no íon observado para quercetina (m/z 271), kaempferol (m/z 255) e Isorhamnetin (m/z 285).

Todos os derivados de quercetina apresentaram íon fragmento em m/z 303 e m/z 301 no modo negativo positivo e negativo de ionização, respectivamente, nos quais corroboram com m/z para a aglicona quercetina. Para assegurar a identidade da aglicona, os espectros no modo negativo de ionização MS^2 de todos os derivados da quercetina exibiram íons fragmento em m/z 179, m/z 255 e m/z 271, que é formado por uma fragmentação específica da aglicona quercetina que está de acordo com estudos anteriores (ABLAJAN, et. al, 2006; FABRE, et. al, 2001; KAJDŽANOSKA, et. al, 2010).

O Composto 1 ($R_t = 40,8$ min) no espectro do modo de ionização positivo (Figura 13) exibiu um íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 597. No espectro de MS^2 foi observado um íon fragmento predominante em m/z 303 $[\text{M}+\text{H}-294]^+$. A perda de 294 u ocorreu em uma eliminação sequencial de 132 u e 162 u, que indicam um dissacarídeo formado por uma pentose terminal e hexose ligada a aglicona na posição 3-O. No espectro do modo negativo de ionização (Figura 2) foi observado um íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 595. A análise de MS^2 forneceu um íon característico em m/z 179 e m/z 255 que levou a inferir a aglicona como quercetina e o composto caracterizado como quercetina-3-O-hexose-pentosídeo.

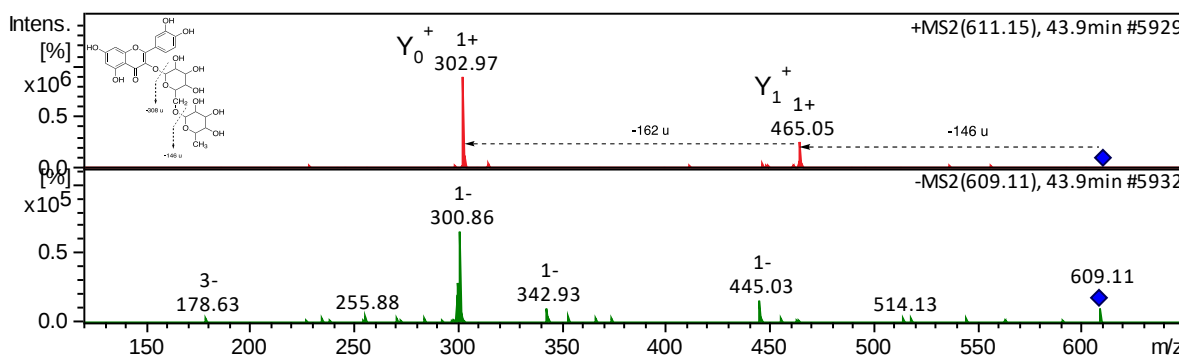
Figura 13: Espectro ESI- MS^2 no modo positivo e negativo da quercetina-3-O-hexose-pentosídeo



O Composto 2 ($R_t = 43,9$ min) exibiu um íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 611 no modo positivo de ionização (Figura 14). No espectro de MS^2 , foi observado um íon fragmento predominante em m/z 303 $[\text{M}+\text{H}-308]^+$. O íon em m/z 303 foi formado após a perda da desoxihexose terminal

(146 u) e hexose (162 u), respectivamente, com a hexose ligada à aglicona na posição 3-O. No modo negativo de ionização (Figura 14), foi observado um íon $[M-H]^-$ em m/z 609. A análise de MS^2 forneceu um íon característico em m/z 179 e m/z 255 que levou a inferir a aglicona como quercetina e o composto como quercetina-3-O-rutinosídeo.

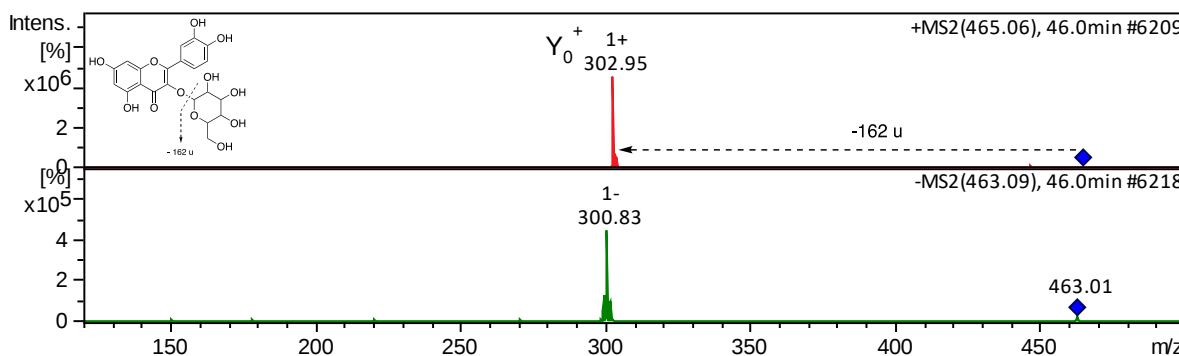
Figura 14: Espectro ESI- MS^2 no modo positivo e negativo da quercetina-3-O-rutinosídeo



O Composto 3 ($R_t = 46,0$ min) no modo positivo de ionização exibiu um íon $[M+H]^+$ em m/z 465 (Figura 15). No espectro de MS^2 foi observado um íon fragmento majoritário em m/z 303 $[M+H-162]^+$. A perda de 162 u corresponde a uma eliminação da unidade de hexose (galactopiranosídeo).

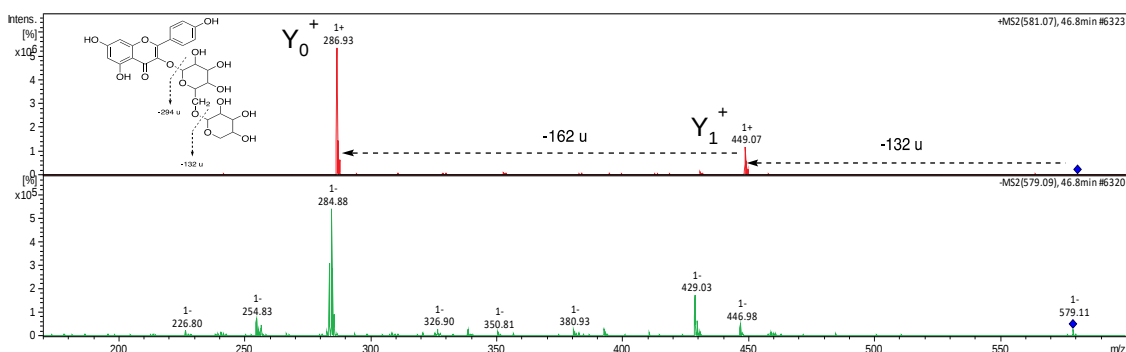
No modo negativo de ionização (Figura 15), foi observado um íon $[M-H]^-$ em m/z 463. A análise de MS^2 forneceu um íon característico em m/z 179 e m/z 255 que levou a inferir a aglicona como quercetina e o composto como quercetina-3-O-hexosídeo.

Figura 15: Espectro ESI- MS^2 no modo positivo e negativo da quercetina-3-O-hexosídeo



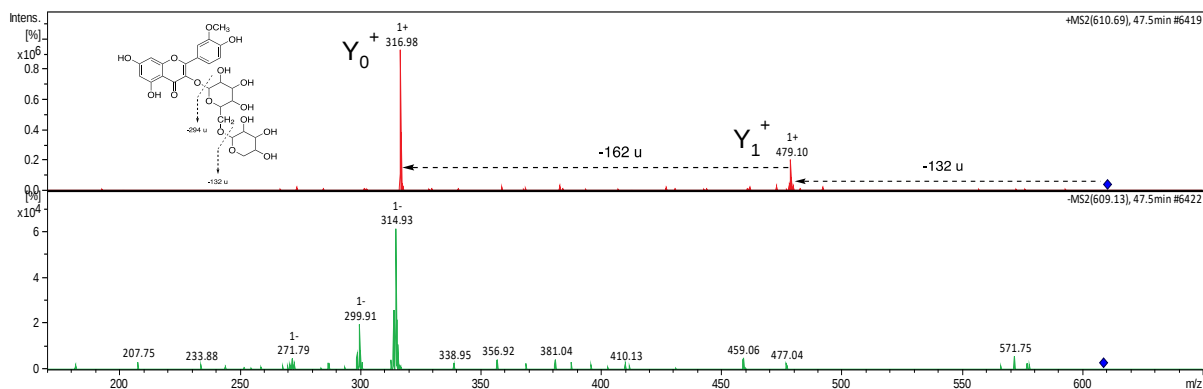
O Composto 4 ($R_t = 46,8$ min) no espectro de modo positivo de ionização (Figura 16) exibiu um íon $[M+H]^+$ em m/z 581. No espectro de MS^2 , um fragmento principal em m/z 287 $[M+H-294]^+$ foi observado. A perda de 294 u ocorreu sequencialmente pela eliminação da unidade de pentose (132 u) e uma unidade de hexose (162 u), o que sugere um dissacarídeo com uma pentose terminal e hexose ligada à aglicona.

No modo negativo de ionização (Figura 16), foi observado um íon $[M-H]^-$ em m/z 579. A análise de MS^2 fornece um íon característico em m/z 255, 227 que levou a inferir a aglicona como kaempferol e o composto pode ser atribuído como kaempferol-3-O-hexose-pentosídeo.

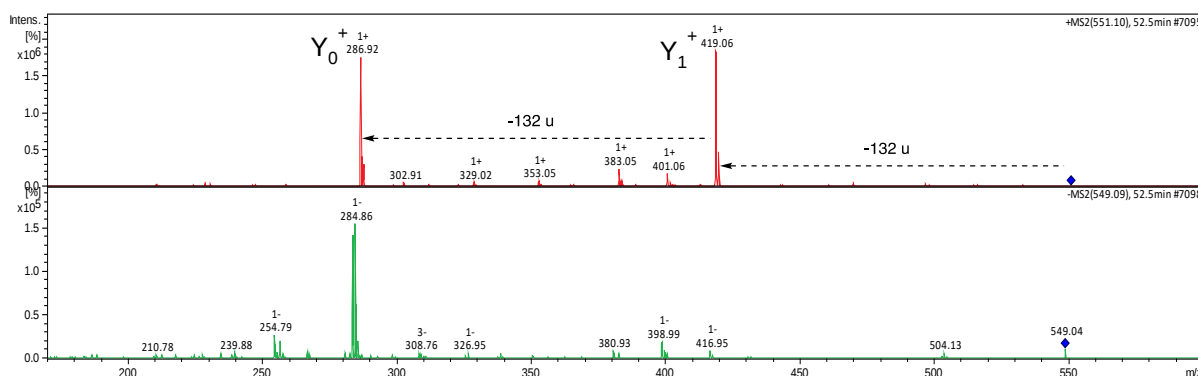
Figura 16: Espectro ESI-MS² no modo positivo e negativo kaempferol-3-O-hexose-pentosideo.

O composto 5 ($R_t = 47,5$ min) exibiu íon em $[M+H]^+$ 611 e $[M-H]^-$ 609 no modo de ionização positivo e negativo, respectivamente (figura 17). A análise de MS² no modo positivo de ionização revelou a perda consecutiva de uma pentose terminal seguida de uma unidade de hexose, que está conectada à posição 3-O da aglicona.

Na análise MS² do modo negativo de ionização foi observada a presença de íons fragmento em m/z 300, 271 e 255 (figura 17) conforme proposto em um estudo da via de fragmentação da isorhamnetina proposto por Chen e colaboradores (2015). Desta forma, o composto foi atribuído como isorhamnetin-3-O-hexose-pentoside.

Figura 17: Espectro ESI-MS² no modo positivo e negativo da isorhamnetin-3-O-hexose-pentoside

O Composto 6 ($R_t = 52,5$ min) exibiu um íon $[M+H]^+$ em m/z 551 (Figura 18). Os espectros de MS² forneceram os íons m/z 419 e m/z 287 que sugeriu a perda de duas unidades de pentose ligadas entre si e resultando no íon que corresponde a aglicona kaempferol. No modo negativo (Figura 18), foi observado um íon em m/z 549. A análise de MS² forneceu um íon característico em m/z 285, 255, 227 que levou a inferir o composto como kaempferol-3-O-pentosil-pentosideo.

Figura 16: Espectro ESI-MS² no modo positivo e negativo da kaempferol-3-O-pentosil-pentosideo

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do estudo preliminar apontar alto potencial de atividade antirradicalar para a fase em butanol, a quantificação da atividade antirradicalar não apresentou resultados significativos para a fase em butanol com base na comparação com Quercetina e Trolox. No que tange o perfil cromatográfico, a fase em butanol se mostrou composta de compostos fenólicos, sobretudo flavonóides com a caracterização de seis flavonóis.

6. REFERÊNCIAS

- ABLAJAN, K., ABLIZ, Z., SHANG, X., HE, J., ZHANG, R., SHI, J. Structural characterization of flavonol 3,7-di-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, V. 41, 352-360, 2006.
- BREWER M.S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 10, p. 221-247, 2011.
- CHAMBERS, P. A., LACOUL, P., MURPHY, K. J., THOMAZ, S. M. Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. *Hydrobiologia*, v. 595, p. 9-26, 2008.
- CHEN, Y., YU, H., WU, H., PAN, Y., WANG, K., JIN, Y., ZHANG, C. Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration. *Molecules*, v. 20, 18352-18366, 2015.
- CUYCKENS, F., CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of mass spectrometry*, v. 39, 1-15, 2004.
- GRECA, M. D., FIORENTINO, A., MONACO, P., PREVITERA, L. Polyoxygenated oleanane triterpenes from *Hydrocotyle ranunculoides*. *Phytochemistry*, v.35, 201-204, 1993.
- FABRE, N., RUSTAN, I., DE HOFFMANN, E., QUETINI LECLERQ, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, v. 12, 707-715, 2001.

FIASCHI, P. Araliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5122>> acesso em 20/03/2019.

HUANG, H.-C., LIAW, C.-C., ZHANG, L.-J., HO, H.-U., KUO, L.-M. Y., SHEN, Y.-C., KUO, Y.-H. Triterpenoidal saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Phytochemistry*, v. 69, 1597-1603, 2008.

KAJDŽANOSKA, M. GJAMOVSKI, V. STEFOVA, M. HPLC-DAD-ESI-MSⁿ Identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, v. 29, 181-194, 2010.

MATSUSHITA, A., SASAKI, Y., WARASHINA, T., MIYASE, T., NOGUCHI, H., VANDER VELDE, D. Hydrocotylosides I-VII, New Oleanane Saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Journal of Natural Products*, v. 67, 384-388, 2004.

NIMSE S. B.; PAL D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, v. 5, p. 27986-28006, 2015.

RAMOS, F., TAKAISHI, Y., KAWAZOE, K., OSORIO, C., DUQUE, C., ACUÑA, R., FUJIMOTO, Y., SATO, M., OKAMOTO, M., OSHIKAWA, T., AHMED, S. U. Immunosuppressive diacetylenes, ceramides and cerebrosides from *Hydrocotyle leucocephala*. *Phytochemistry*, v. 67, 1143-1150, 2006.

SILVA, C. B., CÂNDIDO, A. C. S., SIMIONATTO, E., FACCENDA, O., SCALON, S. D. P. Q., PERES, M. T. L. P. Atividade alelopática, antioxidante e teor de fenóis totais de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae). *Technology Acta Scientiarum* v. 32, 413-420, 2010.

TABOPDA, T. K., MITAINE-OFFER, A.-C., MIYAMOTO, T., TANAKA, C., MIRJOLET, J.-F., DUCHAMP, O., NGADJUI, B. T., LACAILLE-DUBOIS, M.-A. Triterpenoid saponins from *Hydrocotyle bonariensis* Lam. *Phytochemistry*, v. 73, 142-147, 2012.

TSIMOGIANNIS, D., SAMIOTAKI, M., PANAYOTOU, G. OREOPOULOU, V. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, v. 12, 593-606, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MANZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39, p. 44-84, 2007.

VUKICS, V., GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 29, 1-16, 2010.

Contatos: gustavoneves99@hotmail.com e edgard.ferreira@mackenzie.br